

Patent Reference 2

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-234396
 (43)Date of publication of application : 08.09.1998

(51)Int.Cl. C12P 33/00
 A61K 31/045
 A61K 31/35
 C12N 1/14
 // A61K 35/78
 (C12P 33/00
 C12R 1:80)
 (C12N 1/14
 C12R 1:80)

(21)Application number : 09-055459 (71)Applicant : NIPPON KAYAKU CO LTD

(22)Date of filing : 25.02.1997 (72)Inventor : NISHIGORI TAKAAKI
 SUZUKI KATSUHIRO
 FUJITA SHINJI

(54) PRODUCTION OF NEW ANTITUMOR AGENT AND SOYASAPOGENOL B

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject compound useful as an active ingredient, etc., of an antitumor agent by culturing a bacterium belonging to the genus Penicillium and having a production capability of a physiologically active substance, Soyasapogenol B in a medium and collecting a product from the culturing liquid.

SOLUTION: This new antitumor agent, Soyasapogenol B, having a suppressing effect for proliferation of various cancer cells and a relatively low toxicity, exhibiting excellent antitumor activities to solid cancers to which the manifestation of an efficacy is difficult with conventional antitumor agents, especially to colic/rectal cancer, cancers in digestive organs, etc., and especially useful as an active ingredient of a treating agent for the colic/rectal cancer, is obtained by culturing a microorganism belonging to the genus Penicillium and having a production capability of a physiologically active substance, Soyasapogenol B [e.g.; Penicillium-sp NF03900 (FERM-P-15901), etc.] in a medium to produce and accumulate the physiologically active substance Soyasapogenol B in a culturing liquid, and collecting the substance.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's

* NOTICES *

JPO and NCIPi are not responsible for any
damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The antitumor agent which makes an active principle physiological active substance soya sapogenol B.

[Claim 2] The manufacturing method of the soya sapogenol B which belongs to a Penicillium, cultivates the microorganism which has physiological active substance soya sapogenol B productivity in a culture medium, carries out generation and recording of the physiological active substance soya sapogenol B into culture medium, and is characterized by extracting this.

[Claim 3] Penicillium ESUPI 03900 shares of NF, and its variant

[Translation done.]

* NOTICES *

JPO and NCIPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.**** shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

OPERATION

[Function] Next, the example of an experiment shows the antitumor action of this invention.

It is an example Homo sapiens colon cancer cell of an experiment 5.0x104 They are an individual / ml, or a Homo sapiens ovarian cancer cell 2x104 200microl inoculation of was done at the individual / a rate of ml at 96 hole culture plate, and what diluted the test drug with the physiological saline was added by various concentration after 24-hour culture. Then, 37 degrees C and 5%CO2 It cultivated by the incubator for 72 hours. The viable count was measured by the MTT method after culture, and it asked for growth inhibition concentration (IC50) 50% to control from the absorbance. A result is shown in Table 1.

[0010]

[Table 1]

Table 1. Growth depressant action cell name over various cancer cells IC50 (mug/ml)

SW480 (Homo sapiens colon cancer) 2.7A2780 (Homo sapiens ovarian cancer) As shown in 7.5 table 1, this compound showed strong growth depressant action to various cancer cells.

[0011] Physiological active substance soya sapogenol B showed the growth depressant action to various cancer cells as mentioned above.

[0012] Its all are usable if the production bacillus of the soya sapogenol B used by this invention is strain which belongs to a Penicillium and has soya sapogenol B productivity. As a ***** thing, for example HOKUSUWASU (D. L.Haworth), Sutton (B. C.Sutton) and edited by Ainsworth (G. C.Ainsworth) — Ainsworth — and — screw bead dictionary OBU THE Juan Jiayi — the 7th edition (Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi and 7th ed. (1983)) — following — a fungus gate — It becomes clear that it is classified into an imperfect subphylum, an imperfect mold rope, and the genus Penicillium, and it is penicillium about a bacteria stock. It was named ESUPI NF 03900 (Penicillium sp.NF03900). In addition, this strain is the deposition number FERM to National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology. It ****es as P-15901. This strain can also use these variants, as long as it can make it vary to approaches, such as the usual variation approach, for example, UV irradiation, and radiation irradiation, and has the productivity of soya sapogenol B. Hereafter, the mycology-property of 03900 shares of NF and a physiological property are shown.

[0013]

[Mycology-property]

- i. The growth condition when cultivating for 25 degrees C and seven days on the growth various culture media in various culture media is shown

in Table 2. The bacteria stock of the growth on a Czapek's-yeast-extract-agar culture medium is good, and serves as the shape of the shape of velvet, and felt, the wrinkling of a radial is formed, and a center section rises a little. Blue green is presented to ashes orange, a yellowish-white color, white, and the back, applying [of a cluster] it to a periphery from a center section. Moreover, a colorless decoction is produced. A rear face presents and makes brown sour orange brown, cream, and the back. Conidium formation is good. The growth on the potato dextrose agar and a malt extract agar medium is good, and serves as a flat cluster of the shape of powder and velvet. The front face of a cluster presents a bluish green color, blue green, and gray. Moreover, a colorless decoction is produced. A rear face presents a yellowish-white color and ashes yellow. It may become rarely green. The growth on a TSUAPEKKU agar medium is restrictive, and an aerial mycelium spreads thinly and it serves as a flat cluster. A front face presents ashes orange and blue green to gray and the back. A rear face serves as ashes orange in white and the back. Conidium formation is a little bad.

[0014] 2. Indicate below the gestalt-description under the optical microscope of the bacteria stock grown on the gestalt-description malt extract agar medium. A hypha has 1.0 to 3.5 micrometer width of face, colorlessness, a glide plane, and a septum. A conidiophore is produced from substrate mycelium or an aerial mycelium. Magnitude is 24-55x2.0 to 3.5 micrometer. a front face — a glide plane — or — a little — a split face. Two to 4 whorl of METORE is carried out from the apex of a conidiophore. Magnitude is 7-10x2.0 to 3.5 micrometer. A front face is a glide plane or a split face. Two to 7 whorl of the phialide is carried out from METORE. Magnitude is 8-10x2.0 to 3.0 micrometer. A form is an ampul form, a brunt form, and a nib form. A front face is a glide plane. It is generated from the tip of phialide in a FIARO mold conidium, and a conidium stands in a row in the shape of a chain. Magnitude is 2.0 to 3.5 micrometer. A form turns into a globular form, globoid, and an ellipse form. a front face — a glide plane — or — a little — a split face.

[0015]

[Physiological property] A bacteria stock is aerotropism, in a malt extract agar medium, the growth pH range is as wide as 2-12, and optimal pH is 7-8. Moreover, growth optimum temperature is 30 to 32 degree C, and although it does not grow at 5 degrees C, it is grown at 37 degrees C.

[0016]

[Table 2]

flask for rotary mold shakers Glucose 1%, Shoe cloth 2% and horse mackerel prong (Ajinomoto Co., Inc. make) 2%, 0.1% of potassium dihydrogenphosphates, 0.025% of magnesium sulfate, pro NARU ST-I 0.01%, 0.00011% of an iron sulfate and 7 hydrates, 0.00064% of a copper sulfate and 5 hydrates, 100ml (pH6.5) of culture media of 0.00015% of a zinc sulfate and 7 hydrates and 0.00079% of a manganese chloride and 4 hydrates is poured distributively. 2ml of 120 degrees C of said seed culture liquid was transplanted to the flask which carried out autoclave sterilization for 20 minutes, and shaking culture was performed under the conditions of 25 degrees C and 220 revolutions per minute on the 7th. Suction filtration of the culture medium was carried out, and it classified to the fungus body and the filtrate.

[0023] The following actuation was carried out to isolation of the soya sapogenol B from culture medium. Culture was suspended, after preparing 10L of culture filtrate obtained by carrying out a fungus body a #* exception to pH9, according to the conventional method, ethyl acetate extracted the active substance from this culture filtrate, and 629.5mg of rough matter was obtained. The rough matter was made to stick to diamond ion CHP-20 (Mitsubishi Kasei Corp. make) further, and when it was eluted in the 0.5L [of acetonitriles] linear gradient from 0.5L of acetonitrile water 50%, elution of the effective matter was carried out. Using the silica gel column (micro bead silica gel 4B (30-50μ), the FUJI SHIRISHIA chemical company make), the activity fraction refined with the n-hexane-acetone (6:1) and obtained the effective matter. Elution and an activity fraction were further condensed for this with the methanol using sephadex LH-20 (Pharmacia manufacture) column 100ml, and 26.4mg soya sapogenol B was obtained.

[0024] the soya sapogenol B obtained in the above-mentioned example is physicochemical — since all of description and various spectrum data agreed with well-known soya sapogenol B, it was checked that the matter obtained in the example is soya sapogenol B.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-234396

(43)公開日 平成10年(1998)9月8日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 12 P 33/00

C 12 P 33/00

A 6 1 K 31/045

A 6 1 K 31/045

31/35

31/35

C 12 N 1/14

C 12 N 1/14

A

// A 6 1 K 35/78

A 6 1 K 35/78

J

審査請求 未請求 請求項の数 3 FD (全 5 頁) 最終頁に統ぐ

(21)出願番号

特願平9-55459

(71)出願人 000004086

日本化薬株式会社

東京都千代田区富士見1丁目11番2号

(22)出願日

平成9年(1997)2月25日

(72)発明者 錦織 隆昭

埼玉県与野市上落合1039

(72)発明者 鈴木 勝広

埼玉県与野市上落合1039

(72)発明者 藤田 真司

埼玉県浦和市元町1-33-15-202

(54)【発明の名称】 新規抗腫瘍剤およびソヤサボゲノールBの製造法

(57)【要約】

【課題】新規な抗腫瘍剤を提供する。

【解決手段】ソヤサボゲノールBを有効成分とする抗腫瘍剤。

【特許請求の範囲】

【請求項1】生理活性物質ソヤサポゲノールBを有効成分とする抗腫瘍剤。

【請求項2】ペニシリウム属に属し、生理活性物質ソヤサポゲノールB生産能を有する微生物を培地中で培養し、培養液中に生理活性物質ソヤサポゲノールBを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするソヤサポゲノールBの製造法。

【請求項3】ペニシリウム エスピ－ NF03900 株およびその変異株

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は生理活性物質ソヤサポゲノールBを有効成分とする抗腫瘍剤およびソヤサポゲノールBの新規製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】ソヤサポゲノールBは大豆 (Glycine max MERRILL) 種子から単離・構造決定され (Chem. Pharm. Bull., 24, 121-129, 1976; Chem. Pharm. Bull., 30, 2294-2297, 1982)、抗体活性及び血小板凝集抑制作用、腎炎、リューマチ、全身性紅斑性狼瘡等の免疫疾患または自己免疫疾患の予防及び治療薬並びに血栓症の予防及び治療薬として知られている (特開昭61-37749)。また、血管新生及び毛髪の成長の促進、皮膚の老化及び抜毛予防の効果が知られている (FR2669225)。微生物によるソヤサポゲノールBの生産はストレプトミセス エスピ－ (Streptomyces sp. H 1082-MY 15) のみが知られている (Chem. Pharm. Bull., 32, 1287-1293, 1994)。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】従来の癌患者に対する化学療法にはアルキル化剤、代謝拮抗剤、抗生物質、ステロイド剤、葉酸拮抗剤、植物アルカロイド等が知られているが、まだ十分ではなく、従来の制癌剤では効果の発現が難しいといわれている大腸癌、消化器癌、肺癌等に効果を示す薬剤が望まれている。

【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは上記作用を示す抗腫瘍剤を見出すべく鋭意研究の結果、ソヤサポゲノールBが抗腫瘍活性を有する化合物である事、またペニシリウム属に属しソヤサポゲノールB生産能を有する微生物を培地中で培養し、ソヤサポゲノールBを生成蓄積せしめ、得られた培養液からそれを採取できる事を見出し本発明に到達したものである。即ち、本発明は次の(1)～(3)に関する。

【0005】(1) 生理活性物質ソヤサポゲノールBを有効成分とする抗腫瘍剤。

(2) ペニシリウム属に属し、生理活性物質ソヤサポゲノールB生産能を有する微生物を培地中で培養し、培養液中に生理活性物質ソヤサポゲノールBを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするソヤサポゲノールBの製造法。

(3) ペニシリウム エスピ－ NF03900 株およびその変異株。

【0006】本発明の抗腫瘍剤を用いる場合、単独または賦形剤あるいは担体と混合して注射剤、経口剤または座薬等として投与される。賦形剤あるいは担体としては薬理学的に許容されるものが選ばれ、その種類及び組成は投与経路や投与方法によって決まる。例えば液体担体として水、アルコール類もしくは大豆油、ピーナッツ油、ゴマ油、ミネラル油等の動植物油、または合成油が用いられる。固体担体としてマルトース、シュークロース等の糖類、アミノ酸類、ヒドロキシプロピルセルロース誘導体、ステアリン酸マグネシウム等の有機酸塩類等が使用される。

【0007】注射剤の場合、担体として一般には生理食塩水、各種緩衝液、グルコース、イノシトール、マンニトール等の糖類溶液、エチレンギリコール、ポリエチレンギリコール等のグリコール類が望ましい。また、イノシトール、マンニトール、グルコース、マンノース、マルトース、シュークロース等の糖類、フェニルアラニン等のアミノ酸等の賦形剤と共に凍結乾燥剤とし、それを投与時に注射用の適当な溶剤、例えは滅菌水、生理食塩水、ブドウ糖液、電解質溶液、アミノ酸等の静脈投与用液体に溶解して投与することもできる。

【0008】製剤中における本化合物の含量は製剤により種々異なるが、通常0.01～100重量%好ましくは0.1～50重量%である。例えば注射液の場合には、通常0.1～30重量%、好ましくは1～10重量%の有効成分を含むようにすることが良い。経口投与する場合には、前記固体担体もしくは液状担体とともに錠剤、カプセル剤、粉剤、顆粒剤、液剤、ドライシロップ剤等の形態で用いられる。カプセル、錠剤、顆粒、粉剤は一般に5～100重量%、好ましくは25～98重量%の有効成分を含む。

【0009】投与量は患者の年令、体重、症状、治療目的等により決定されるが、治療量は一般に、非経口投与で1～100mg/kg/日、経口投与で5～500mg/kg/日程度がよい。本発明の抗腫瘍剤は固型癌特に大腸癌などの消化器系癌に特に優れた作用を示し、固型癌治療剤特に大腸癌治療剤として有用である。

【作用】次に本発明の抗腫瘍作用を実験例により示す。
実験例

ヒト大腸癌細胞を 5.0×10^4 個/ml、あるいはヒト卵巣癌細胞を 2×10^4 個/mlの割合で96穴培養プレートに $200 \mu l$ 接種し、24時間培養後、被験薬50 を生理食塩水で希釈したものを種々の濃度で添加した。

その後、37℃、5%CO₂ インキュベータで72時間培養した。培養後、生細胞数をMTT法により測定し、その吸光度からコントロールに対する50%増殖阻害濃度 (IC₅₀) を求めた。結果を表1に示す。

【0010】

【表1】

細胞名	IC ₅₀ (μg/ml)
SW480 (ヒト大腸癌)	2.7
A2780 (ヒト卵巣癌)	7.5

表1に示すように、本化合物は各種癌細胞に対して強い増殖抑制作用を示した。

【0011】上記のように生理活性物質ソヤサポゲノールBは各種癌細胞に対する増殖抑制作用を示した。

【0012】本発明で使用されるソヤサポゲノールBの生産菌はペニシリウム属に属し、ソヤサポゲノールB生産能を有する菌株であればいずれも使用可能であり。好的なものとしては、例えば、ホークスワース (D. L. Hawksworth)、サットン (B. C. Sutton)、エーンズワース (G. C. Ainsworth) 編、「エーンズワース・アンド・ビスピーズ・ディクショナリー・オブ・ザ・ファンジය」第7版 (Ainsworth and Bisby's Dictionary of the Fungi, 7th ed. (1983)) に従い、真菌門、不完全菌亜門、不完全糸状菌綱、ペニシリウム属菌に分類されることが判明し、本菌株をペニシリウム エスピー NF03900 (Penicillium sp. NF03900) と命名した。なお、該菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託番号FERM P-15901として寄託されている。この菌株は通常の変異方法例えは紫外線照射、放射線照射などの方法に変異させることができ、ソヤサポゲノールBの生産能を有する限り、これらの変異株も使用できる。以下、NF03900株の菌学的性質および生理学的性質を示す。

【0013】

【菌学的性質】

1. 各種培地での生育

各種培地上で25℃、7日間培養したときの生育状態を表2に示す。本菌株は、ツアペック・イーストエキス寒天培地上での生育は良好で、ピロード状、フェルト状となり、放射状のしわを形成し中央部はやや盛り上がる。集落の表面は中央部から周縁にかけて灰橙色、黄白色、白色、後に灰緑色を呈する。また無色の浸出液を生じる。裏面は橙褐色、クリーム色、後に褐色を呈する。分生子形成は良好である。ポテト・デキストロース寒天培地、麦芽エキス寒天培地上での生育は良好で粉状、ピロード状の平坦な集落となる。集落の表面は青緑色、灰緑色、灰色を呈する。また無色の浸出液を生じる。裏面は黄白色、灰黄色を呈する。まれに緑色となることもある。ツアペック寒天培地上での生育は制限的で気生菌糸が薄く広がり平坦な集落となる。表面は灰色、後に灰橙色、灰緑色を呈する。裏面は白色、後に灰橙色となる。分生子形成はやや悪い。

【0014】2. 形態的特徴

麦芽エキス寒天培地上で生育した本菌株の光学顕微鏡下での形態的特徴を以下に記載する。菌糸は幅1.0-2.5 μm、無色、滑面、隔壁を有する。分生子柄は基中菌糸あるいは気生菌糸より生じる。大きさは24-55×2.0-3.5 μm。表面は滑面またはやや粗面。メトレは分生子柄の頂端より2-4本輪生する。大きさは7-10×2.0-3.5 μm。表面は滑面又は粗面。フィアリドはメトレより2-7本輪生する。大きさは8-10×2.0-3.0 μm。形はアンブル形、ほこ形、ペン形。表面は滑面。分生子はフィアロ型分生子でフィアリドの先端より生じ鎖状に連なる。大きさは2.0-3.5 μm。形は球形、亜球形、橢円形となる。表面は滑面又はやや粗面。

【0015】

【生理学的性質】本菌株は、好気性で、麦芽エキス寒天培地において生育pH範囲は2-12と広く、至適pHは7-8である。また、生育至適温度は30-32℃で、5℃で生育しないが37℃では生育する。

【0016】

【表2】

表2

培地	集落形態 集落の径	集落表面色調	集落裏面色調	分生子 形成	浸出液
CYA	フェルト状 24-26mm	灰橙色 灰緑色	橙褐色	++	+
MEA	ビロード状 22-25mm	青緑色 灰緑色	灰黄色 クリーム色	+++	++
PDA	ビロード状 26-30mm	青緑色 灰緑色	灰黄色 クリーム色	+++	++
CZA	ビロード状 9-12mm	灰色・灰橙色 灰緑色	白色・灰橙色	++	-
G25N	フェルト状 1-2mm	灰色	淡褐色	+	-
OMA	ビロード状 32-39mm	青緑色 灰緑色	淡黄褐色	+++	+
SA	フェルト状 27-31mm	灰橙色 灰緑色	橙褐色	++	++
CMA	ビロード状 20-22mm	灰緑色	白色	++	-

C Y A ; ツアベックイーストエキス寒天培地、M E A ; 麦芽エキス寒天培地、

P D A ; ポテトデキストロース寒天培地、C Z A ; ツアベック寒天培地、

G 2 5 N ; 2 5 % グリセロール硝酸塩寒天培地、O M A ; オートミール寒天
培地、S A ; サブロー寒天培地、C M A ; コーンミール寒天培地、

- ; 無し、+ ; 少量、++ ; 普通、+++ ; 多量。

【0017】本発明により生理活性物質ソヤサポゲノールBを製造するにはペニシリウム属に属し、生理活性物質ソヤサポゲノールBを產生する能力を有する微生物を培地中で培養し培養物中に生理活性物質ソヤサポゲノールB異性体を生成蓄積せしめ、ついでこれを採取すればよい。培養方法は原則的には糸状菌の培養方法に準ずるが、通常は液体培養による深部培養法が有利である。培養に用いられる培地としてはN F O 3 9 0 0 株を利用す
る栄養源を含有する培地であればよい。

【0018】栄養源としては從来から糸状菌の培養に利用されている公知のものが使用でき、通常 炭素源、窒素源および無機塩類からなる郡から選ばれる1種または2種以上を含むものであればよく、例えば、炭素源として、グルコース、ガラクトース、マンニトール、デキストリン、澱粉、水飴(澱粉麦芽糖化物)、大豆油など単独または組み合わせて用いることができる。無機および

40 有機空素源としては、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、窒素、硝酸アンモニウム、硝酸ソーダ、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、コーン・スチップ・リカーカー、大豆油カス、オートミール、カザミノ酸、バクトソイントン、ソリブルベジタブルプロテインなど単独または組み合わせて用いることができる。

【0019】その他、必要に応じて食塩、硫酸マグネシウム、硫酸銅、硫酸亜鉛、塩化マンガン、炭酸カルシウム、磷酸塩などの無機塩を加えることができる他、本菌の生育や、生理活性物質ソヤサポゲノールBの生産を促進する有機物、例えば核酸類、アミノ酸、ビタミン類や無機物を適当に添加することができる。培養温度は通常20~37℃、好ましくは25℃~32℃、pHは中性ないし微酸性で培養を行うことが望ましい。液体培養では通常3~6日間培養を行うと生理活性物質ソヤサポゲノールBが培養液中に蓄積される。

【0020】培養液からのソヤサポゲノールBの単離には、一般に微生物代謝産物をその培養液から単離するために用いられる分離精製の方法が用いられる。例えば、培養液中のソヤサポゲノールBの生成量が最大に達した時に培養を停止し、菌体を濾別して得られる培養濾液中より目的物を精製単離する。培養濾液は有機溶媒例えば、酢酸エチルで活性物質を有機溶媒相に抽出する。有機溶媒層は減圧濃縮し、粗物質を得る。粗物質はさらに脂溶性物質の精製に通常用いられる公知の方法、例えば、シリカゲル等を用いるクロマトグラフィーあるいは再結晶化法を単独にまたは適宜組み合わせることにより精製する。精製に好適な例としてシリカゲルを用い、溶出液としてユーヘキサンーアセトンを用いるカラムクロマトグラフィー法が挙げられる。これらの方法で精製、濃縮し、ソヤサポゲノールBを無色粉末として得ることができる。

【0021】以下本発明の実施例を示すが、これは単なる一例示であって何等本発明を限定するものではなく、種々の変法が可能である。

【0022】実施例1

ロータリー型振盪機用500ml容三角フラスコにグルコース1%、シュークロース2%、アジプロン（味の素社製）1.5%、ペプトン0.3%、イーストエキストラクト0.2%、リン酸二水素カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.025%、プロナールST-I 0.01%、硫酸鉄・7水和物0.00011%、硫酸銅・5水和物0.00064%、硫酸亜鉛・7水和物0.00015%、および塩化マンガン・4水和物0.00079%の培地（pH 6.5）100mlを分注し、120℃、20分間オートクレーブ滅菌したフラスコに前記種培養液2mlを移植し、25℃、220回転／分の条件下で7日振盪培養を行った。培養液を吸引ろ過し、菌体とろ液に分別した。

- 10 * カリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.025%、プロナールST-I 0.01%、硫酸鉄・7水和物0.00011%、硫酸銅・5水和物0.00064%、硫酸亜鉛・7水和物0.00015%、および塩化マンガン・4水和物0.00079%の培地（pH 6.5）100mlを分注し、120℃、20分間オートクレーブ滅菌したフラスコに前記種培養液2mlを移植し、25℃、220回転／分の条件下で7日振盪培養を行った。培養液を吸引ろ過し、菌体とろ液に分別した。
- 10 【0023】培養液からのソヤサポゲノールBの単離には、以下の操作を行った。培養を停止し、菌体を濾別して得られる培養濾液10リットルをpH 9に調製した後、この培養濾液から活性物質を常法に従い酢酸エチルで抽出を行い、粗物質62.9. 5mgを得た。粗物質はさらにダイアイオンCHP-20（三菱化成社製）に吸着させ、50%アセトニトリル0.5リットルからアセトニトリル0.5リットルへのリニアグラジェントで溶出すると有効物質が溶出された。活性画分はシリカゲルカラム（マイクロビーズシリカゲル4B（30-50μ）、フジ・シリシア・ケミカル社製）を用い、ユーヘキサンーアセトン（6:1）で精製を行い、有効物質を得た。これをさらにセファデックスLH-20（ファルマシア社製）カラム100mlを用い、メタノールで溶出、活性画分を濃縮し26.4mgのソヤサポゲノールBを得た。

- 20 【0024】上記実施例で得られたソヤサポゲノールBの物理化学的性状および各種スペクトルデータはすべて公知のソヤサポゲノールBと合致したので、実施例で得られた物質はソヤサポゲノールBであることが確認された。

【0025】

【発明の効果】生理活性物質ソヤサポゲノールBは各種癌細胞に対する増殖抑制作用を有し、かつ比較的低毒性であるので抗腫瘍剤として有用である。

フロントページの続き

(51) Int.CI.^b

識別記号

F I

(C12P 33/00)

C12R 1:80)

(C12N 1/14)

C12R 1:80)